تحقیقی

اثر ترمیمی فراکسیون‌های ان‌بوتانول، اتیل‌استات و آبی و هیدروالکلی گیاه بابونه از طریق بیان ژن عامل رشد عصب پس ازضایعه عصب سیاتیک موش صحرایی

مریم سیاسرکرباسکی[۱]، دکتر مریم طهرانی پور*[۲]، دکتر خدیجه نژاد شاهرخ آبادی[۳]

۱- کارشناس ارشد علوم جانوری، گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران. ۲- دکتری فیزیولوژی جانوری، دانشیار گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران. ۳- دکتری ژنتیک مولکولی، استادیار گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.

چکیده

زمینه و هدف : *عوامل نوروتروفیک باعث افزایش بقا و رشد نورون‌ها شده و بیان آنها در پاسخ به آسیب عصب تغییر می‌یابد. این مطالعه به منظور تعیین اثر ترمیمی فراکسیون‌های ان‌بوتانول، اتیل‌استات، آبی و هیدروالکلی عصاره گیاه بابونه از طریق بیان ژن عامل رشد عصب پس از ضایعه عصب سیاتیک موش صحرایی انجام شد.*

روش بررسی : *در این مطالعه تجربی ۳۶ سر موش صحرایی بالغ نر نژاد ویستار به‌صورت تصادفی در ۶ گروه ۶ تایی قرار گرفتند. گروه‌ها شامل کنترل، کمپرسیون، کمپرسیون + عصاره هیدروالکلی، کمپرسیون + فراکسیون ان‌بوتانول، کمپرسیون + فراکسیون اتیل‌استات و کمپرسیون + فراکسیون آبی با دوز mg/kg/bw ۷۵ بودند. در گروه کنترل پس از بیهوش کردن موش‌ها، عضله در محل عصب سیاتیک بدون آسیب عصب شکافته شد و در گروه کمپرسیون و گروه‌های تیمار عصب سیاتیک پای راست به مدت ۶۰ ثانیه تحت کمپرسیون قرار گرفت. اولین تزریق عصاره به صورت داخل صفاقی بلافاصله بعد از کمپرسیون عصب و دومین تزریق ۷ روز بعد انجام گردید. پس از ۲۸ روز از نخاع قسمت کمری نمونه‌برداری شد و Total RNA استخراج و cDNA سنتز گردید. سپس تغییرات بیان ژن عامل رشد عصب در نمونه‌های بدون تیمار و تیمار با فراکسیون‌های عصاره با روش Δct و دستگاه Real Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.*

یافته‌ها : *میزان بیان ژن عامل رشد عصب در عصب سیاتیک گروه کمپرسیون نسبت به گروه شاهد کاهش آماری معنی‌داری نشان داد ($P<۰/۰۵$). همچنین میزان بیان ژن عامل رشد عصب گروه‌های تیمار با عصاره هیدروالکلی، فراکسیون ان‌بوتانول ، فراکسیون اتیل‌استات و فراکسیون آبی در مقایسه با گروه کمپرسیون افزایش آماری معنی‌داری یافت ($P<۰/۰۵$). در میان تیمارها، عصاره هیدروالکلی نسبت به سایر فراکسیون‌ها دارای اثرات بیشتری بود.*

نتیجه‌گیری : *اثر نوروپروتکتیوی عصاره سرشاخه‌های گیاه بابونه می‌تواند ناشی از افزایش بیان ژن عامل رشد عصب باشد.*

کلید واژه‌ها : *گیاه بابونه ، ژن عامل رشد عصبی ، عصب سیاتیک ، موش صحرایی*

* نویسنده مسؤول : دکتر مریم طهرانی پور ، پست الکترونیکی maryam_tehranipour@mshdiau.ac.ir

نشانی: مشهد، میدان راهنمایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، گروه زیست شناسی، تلفن و نمابر ۳۸۴۳۵۰۵۰-۰۵۱

وصول مقاله : ۱۳۹۴/۶/۲۲ ، اصلاح نهایی : ۱۳۹۴/۱۲/۲ ، پذیرش مقاله : ۱۳۹۴/۱۲/۱۰

مقدمه

آسیب یک عصب محیطی واکنشی به نام دژنراسیون والرین را برمی‌انگیزد (۱) که معمولاً به‌صورت یک سری از فرایندهای تخریبی شروع شده در بخش انتهای آکسون‌ها بعد از یک آسیب تعریف می‌شود و بخش دیستال عصب دستخوش تغییرات مورفولوژیکی شده و منجر به تفکیک و قطعه‌قطعه شدن فیبر عصبی و به دنبال آن گسستگی می‌شود (۲).

عوامل تروفیک عصبی، گروه متنوعی از نوروتروفین‌ها محسوب می‌شوند (۳) که به عنوان عوامل تغذیه‌ای و عوامل رشد عمل کرده (۴) و حفظ و بقای نورون‌ها و از جمله نورون‌های حرکتی به وجود آنها وابسته است (۳). عوامل نوروترفیک می‌توانند از طریق حمایت و تحریک سلول‌های آسیب‌دیده، منجر به رشد اکسونی در الیاف ضایعه دیده مربوط به آنها شوند (۵). این عوامل که در حقیقت لیگاندهای پروتئینی رسپتورهای تیروزین کینازی هستند؛ از طریق انتقال رتروگراد در نورون‌ها به‌وسیله مخروط رشد در آکسون‌های در حال ترمیم جذب شده و به جسم سلولی انتقال می‌یابند (۴). امروزه این باور وجود دارد که نورون‌های حرکتی از اندام هدف، عوامل تروفیک دریافت می‌کنند که بدون این عوامل حفظ و بقای آنها ممکن نیست (۶). کم شدن اثر حمایتی اینگونه عوامل که به اعتبار قطع عصب انجام می‌گیرد؛ احتمالاً به محرومیت اینگونه

نورون‌ها از عوامل تروفیک منجر می گردد (۷) و در اکثر موارد به مرگ سلولی در آنان منتهی می‌شود (۸).

عامل رشد عصب (nerve growth factor: NGF) اولین نوروتروفین شناخته شده است که بر رشد و تمایز نورون‌های سمپاتیکی و نورون‌های حسی اثر می‌گذارد و به عنوان راه‌انداز اصلی پاسخ نورون‌های گانگلیون ریشه خلفی به آسیب از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۴). NGF عامل اختصاصی برای زنده ماندن نورون‌ها است (۹). NGF در پاسخ به آسیب عصب در سلول‌های شوان افزایش یافته و سبب افزایش تکثیر این سلول‌ها می‌شود (۴). سلول‌های شوان نیز عوامل تروفیک متفاوتی را ترشح می‌کنند که می‌توانند به رشد و زنده ماندن نورون‌ها کمک کنند (۱۰). به دنبال قطع آکسون سلول‌های شوان در قطعه انتهایی شروع به تولید NGF می‌کند (۹). افزایش سیتوکاین اینترلوکین-۶ که هم در نورون‌ها و هم در سلول‌های غیرنورونی پس از آسیب عصب محیطی صورت می‌گیرد؛ از طریق گیرنده‌اش سیگنالی را ارسال می‌کند که باعث افزایش بیان ژن‌ها و بازسازی و رشد نورون‌ها می‌شود. عوامل نوروترفیک از جمله NGF در آسیب‌های نورونی بیشتر می‌شود و رشد دوباره آکسون‌ها را تسهیل می‌کند (۱۰).

گیاه بابونه با نام علمی *Anthemis nobilis* یکی از رایج‌ترین گیاهان مورد استفاده در طب سنتی است و برای درمان بیماری‌های دارای التهاب استفاده می‌شود (۱۱). با توجه به افزایش بیان NGF پس از آسیب عصب (۴) و نیز ایجاد التهاب در منطقه آسیب‌دیده و همچنین با توجه به اثر آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی گیاه بابونه (۱۱)؛ این مطالعه به منظور تعیین اثر ترمیمی فراکسیون های ان بوتانول، اتیل‌استات، آبی و هیدروالکلی عصاره گیاه بابونه از طریق بیان ژن NGF پس ازضایعه عصب سیاتیک موش صحرایی انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی روی ۳۶ سر موش صحرایی بالغ نر نژاد ویستار با وزن تقریبی ۳۰۰-۲۵۰ گرم خریداری شده از بخش حیوانات دانشکده داروسازی دانشگاه فردوسی مشهد در دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد طی سال ۱۳۹۳ انجام گردید.

پروتکل بین‌المللی کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید. حیوانات به مدت دو هفته در شرایط نوری ۱۲ ساعت تاریکی – روشنایی، درجه حرارت ۲۴-۲۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت مناسب در حیوانخانه دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحدمشهد نگهداری شدند. آب مورد نیاز حیوانات از آب آشامیدنی شهر و غذای آنها نیز دارای فرمول استاندارد از شرکت جوانه خراسان تهیه شد.

گیاه بابونه تهیه شده توسط مرکز هرباریوم دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد با شماره ۹۷۱۲ تایید شد. سرشاخه‌های گیاه بابونه پس از خشک شدن توسط آسیاب کاملاً پودر گردید. سپس با استفاده از دستگاه سوکسله از آن عصاره هیدروالکلی تهیه شد. ۲۵ گرم از پودر بابونه را داخل کاغذ کارتوش ریختیم و در دستگاه سوکسله قرار دادیم. سپس از ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۲۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد به عنوان حلال استفاده شد. در پایان عصاره‌گیری از عصاره هیدروالکلی حذف حلال انجام گردید. سپس فراکسیون‌های آبی، ان‌بوتانول و اتیل‌استات از عصاره هیدروالکلی تهیه گردید. در نهایت ۶/۳۴ گرم عصاره خشک به‌دست آمد که ۲/۳۴ گرم برای تزریق به یک گروه از موش‌ها کنار گذاشته شد و از بقیه آن برای تهیه فراکسیون‌های ان‌بوتانول، اتیل‌استات و آبی استفاده گردید. برای تهیه فراکسیون ان‌بوتانول ۴ گرم از عصاره هیدروالکلی در ۱۸۰ میلی لیتر آب مقطر حل و محلول حاصل داخل قیف دکانتور ریخته شد. سپس ۵۰ میلی‌لیتر ان‌بوتانول به مایع داخل قیف دکانتور اضافه و خوب تکان داده شد تا مواد کاملاً با همدیگر مخلوط شدند. قیف دکانتور ثابت گذاشته شد تا زمانی که دو فاز از یکدیگر جدا شدند. فاز رویی شامل اجزای غیر قطبی بود که در ان‌بوتانول حل شد. برای تهیه فراکسیون اتیل‌استات، فاز پایینی حاصل از مرحله قبل را که شامل اجزای قطبی و بینابینی بود؛ داخل قیف دکانتور ریخته و به آن ۵۰ میلی‌لیتر اتیل‌استات اضافه کردیم. بعد از تکان دادن قیف و سپس ثابت نگه داشتن آن، دو فاز تشکیل شد. فاز رویی شامل اجزای بینابینی مثل فسفولیپیدها بود که در اتیل‌استات حل شد. بعد از استخراج فراکسیون‌های ان‌بوتانول و اتیل‌استات از مخلوط عصاره هیدروالکلی و آب مقطر موجود در قیف دکانتور، باقیمانده فاز آبی شامل اجزا قطبی مانند ویتامین C و تعدادی از فلاونوئیدها بود. در پایان از هر یک از عصاره‌ها حذف حلال انجام گردید (۱۲).

موش‌ها به صورت تصادفی در شش گروه شش تایی به شرح زیر تقسیم شدند (۱۳).

گروه کنترل: هیچ مداخله‌ای انجام نشد.

گروه کمپرسیون: تحت کمپرسیون قرار گرفتند.

گروه تجربی اول: کمپرسیون + فاز آبی عصاره گیاه بابونه دوز ۷۵ mg/kg/bw.

گروه تجربی دوم: کمپرسیون + فاز اتیل‌استات عصاره گیاه بابونه دوز ۷۵ mg/kg/bw.

گروه تجربی سوم: کمپرسیون + فاز ان‌بوتانول عصاره گیاه بابونه دوز ۷۵ mg/kg/bw.

گروه تجربی چهارم: کمپرسیون + عصاره هیدروالکلی گیاه بابونه دوز ۷۵ mg/kg/bw.

برای کمپرسیون بعد از بیهوشی حیوان با تزریق درون صفاقی ماده بیهوشی زایلازین و کتامین با نسبت ۶ به ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (۱۴)، عصب سیاتیک پای راست آشکار شد و تحت کمپرسیون ضایعه نوع دو (آکسون‌ها دژنره شده دارای غلاف‌های

سالم) قرار گرفتند.

در گروه‌های تیمار اولین مرحله تزریق عصاره گیاه بابونه با دوز ۷۵ mg/kg/bw بلافاصله بعد از کمپرسیون به‌صورت داخل صفاقی انجام شد. پس از به‌هوش آمدن، حیوانات به قفس‌های جداگانه منتقل و در شرایط استاندارد حیوانخانه نگهداری شدند. دومین مرحله تزریق درون صفاقی عصاره گیاه بابونه در گروه‌های تیمار هفت روز پس از اولین تزریق انجام شد (۱۳).

پس از ۲۸ روز از تاریخ کمپرسیون از نخاع ناحیه کمری آنها نمونه‌برداری انجام شد. نخاع تا انتهای مخروط انتهایی از داخل ستون مهره‌ها خارج شد. سپس از انتهای مخروط انتهایی نخاع ۱۸ میلی‌متر بالا رفته و نمونه‌هایی به طول ۸ میلی‌متر تهیه شد. این نمونه‌ها محدوده جسم سلولی نورون‌های تشکیل‌دهنده عصب سیاتیک هستند (۱۴).

پس از انجام مراحل استخراج RNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ خلوص RNA استخراج شده تعیین شد. سپس از روی RNA استخراج شده، cDNA ساخته شد. واکنش Real- time PCR برای تکثیر ژن NGF طبق پروتکل با ۱۰ میکرولیتر سایبرگرین، یک میکرولیتر از هر پرایمر، ۳ میکرولیتر cDNA و ۴/۶ میکرولیتر آب مقطر در دمای ۶۳ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. چرخه‌های Real- Time PCR شامل یک مرحله واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال پرایمر به رشته الگو در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و تکثیر قطعه موردنظر در دمای ۶۳ به مدت یک دقیقه و در پایان یک مرحله توقف واکنش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود.

برای محاسبه تعیین کمیت نسبی در نمونه‌های تیمار شده، ابتدا میزان رونوشت ژن اصلی و ژن مرجع (GAPDH) با استفاده از Δct به‌دست آمد. برای نرمالایز کردن بیان ژن، میزان رونوشت هر ژن را بر ژن مرجع آن تقسیم کردیم. برای تعیین ارزش کمیت نسبی میزان بیان ژن، رونوشت نرمال شده ژن موردنظر در گروه‌های تیمار شده را بر رونوشت نرمال شده آن در گروه کنترل تقسیم کردیم.

برای مقایسه و سنجش میزان بیان ژن، پرایمرهای GAPDH مربوط به ژن GAPDH موش صحرایی طراحی و خریداری شد. برای هر نمونه اصلی یک نمونه حاوی پرایمر GAPDH و نیز پرایمر ژن اختصاصی NGF مورد استفاده قرار گرفت.

توالی نوکلئوتیدی پرایمر Forward و توالی نوکلئوتیدی پرایمر Revers مکمل ژن‌های موردنظر پس از طراحی و اطمینان از اختصاصی بودن محل جفت شدن آنها تهیه گردید. نتایج جستجو نشان داد پرایمرها محل باند شدن اختصاصی را دارا هستند.

ترادف پرایمرهای به‌کار گرفته شده و نیز بهترین دمای Annealing برای هر جفت پرایمر که از طریق گرادیان دمایی تعیین شد؛ در جدول یک آمده است (۱۵).

جدول ۱: توالی پرایمرها و اطلاعات مربوط به آنها

GENES	Primer Sequence	TM
NGF	Forward: 5´TCCACCCACCCAGTCTTCCA- 3´	63 ºC
NGF	Reverse: : 5´GCCTTCCTGCTGAGCACACA- 3´	63 ºC
GAPDH	Forward: 5´TGCTGGTGCTGAGTATGTCG- 3´	60 ºC
GAPDH	Reverse: : 5´GCATGTCAGATCCACAACGG- 3´	60 ºC

با استفاده از تکنیک اسپکتروفتومتری و دستگاه نانودراپ از کیفیت RNA و استخراج صحیح آن اطمینان حاصل شد. سپس با مقایسه مقدار هر نمونه، از هر گروه یک نمونه برای سنتز cDNA انتخاب گردید. این دستگاه به طور اتوماتیک غلظت RNA را با استفاده از جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر محاسبه کرد. پس از آماده‌سازی نمونه، دستگاه غلظت نمونه موردنظر را در طول موج مربوطه، بر حسب نانوگرم بر میکرولیتر محاسبه کرد (۱۶).

از پرایمرهای ژن GAPDH به عنوان هوس کیپینگ ژن استفاده شد. از ژن خانه‌داری با عنوان ژن کنترل و همچنین نسبت بیان ژن اختصاصی به آن استفاده گردید (۱۷).

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری MXPro-4.2 و آزمون ANOVA با سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

نتایج حاصل از نانودراپ نمونه‌های انتخاب شده در جدول ۲ آمده است.

جدول ۲ : غلظت RNA استخراج شده

گروه	غلظت RNA (نانوگرم بر میکرولیتر)
کنترل	۰/۰۹۵
کمپرسیون	۰/۰۹۲
تیمار با عصاره هیدروالکلی	۰/۰۴۲
تیمار با فراکسیون اتیل استات	۰/۰۵۳
تیمار با فراکسیون ان بوتانول	۰/۰۴
تیمار با فراکسیون آبی	۰/۰۷۷

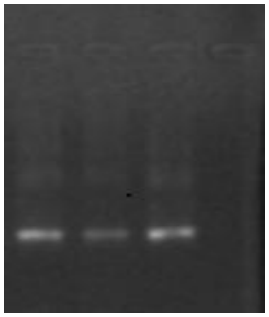
در شکل یک تصویر قسمتی از ژل الکتروفورز مربوط به بیان ژن NGF نشان داده شده است که به خاطر اثبات مناسب بودن پرایمرهای مورد استفاده انجام گردید.

در شکل ۲ تصویر ژل الکتروفورز مربوط به RNA های استخراج شده آمده است. ضمن انجام نانودراپ و تعیین غلظت و کمیت RNA، الکتروفورز بر روی ژل ۱/۵ درصد نیز انجام گردید. سه باند مربوط به استخراج صحیح RNA در شکل مشخص است.

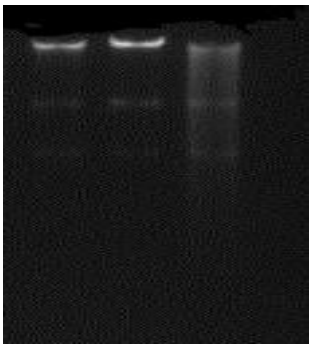
مقایسه شدت بیان ژن NGF در عصب سیاتیک بین گروه کنترل و گروه کمپرسیون در نمودار یک آمده است. بیان ژن NGF پس از گذشت ۲۸ روز در گروه کمپرسیون کاهش آماری معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل یافت ($P<0/001$).

مقایسه شدت بیان ژن NGF در عصب سیاتیک بین گروه

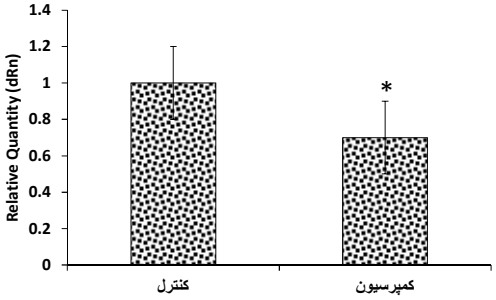
کمپرسیون و سایر گروه‌ها در نمودار ۲ آمده است. شدت بیان ژن بین گروه‌های مختلف در بازه زمانی ۲۸ روز، اختلاف آماری معنی‌داری داشت (P<۰/۰۰۱). بیان ژن GAPDH در نمودار ۳ آمده است.



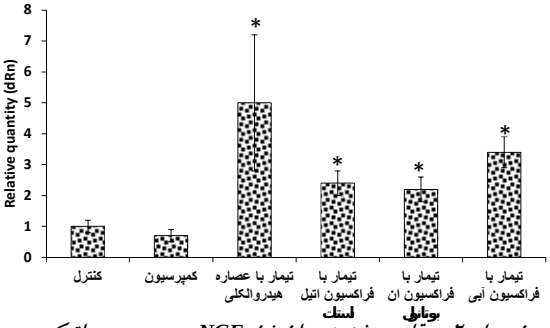
شکل ۱ : تصویر قسمتی از ژل الکتروفورز مربوط به بیان ژن NGF



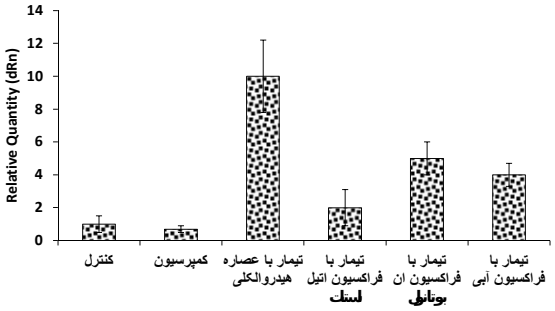
شکل ۲ : تصویر ژل الکتروفورز مربوط به RNA های استخراج شده



نمودار ۱ : مقایسه شدت بیان ژن NGF در عصب سیاتیک بین دو گروه کنترل و کمپرسیون
**** P<۰/۰۰۱***



نمودار ۲ : مقایسه شدت بیان ژن NGF در عصب سیاتیک بین گروه‌های کنترل، کمپرسیون و تیمار (کنترل، هیدروالکلی، ان‌بوتانول، اتیل‌استات و فراکسیون آبی) در بازه زمانی ۲۸ روز
**** P<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه کمپرسیون***



نمودار ۳ : نتایج حاصل از بیان ژن GAPDH در عصب سیاتیک گروه‌های کنترل، کمپرسیون و تیمار

بحث

با توجه به نتایج مطالعه حاضر شدت بیان ژن NGF در گروه کمپرسیون در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری یافت و عصاره‌های هیدروالکلی، فراکسیون ان‌بوتانول، فراکسیون اتیل‌استات و فراکسیون آبی گیاه بابونه با دوز ۷۵ mg/kg/bw در موش‌های با کمپرسیون عصب سیاتیک، باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن NGF گردید که احتمالاً از طریق ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی عناصر محلول در آب این گیاه است. از این میان بیشترین میزان بیان ژن NGF در گروه تیمار با عصاره هیدروالکلی مشاهده شد که شاید نوع ماده موثره و یا میزان آن در عصاره هیدروالکلی به اندازه‌ای بوده تا توانسته اثر حفاظتی بیشتری اعمال نماید.

در مطالعه Dai و همکاران بیان رسپتورهای trk A درگوش داخلی پستانداران بررسی شد. تولید نوروتروفین‌ها در نورون‌های حسی اولیه برای رشد، بلوغ و حفظ سیستم عصبی لازم و ضروری است. NGF به‌طورمستقیم روی سلول‌های گانگلیون ریشه پشتی اثر داشته که نشان می‌دهد NGF احتمالاً قادر به حساس‌سازی پاسخ به آگونیست‌های مضر از رسپتورهای TRPV1 یافت شده در اندام CORTI است. پس احتمالاً NGF نقشی را در وقایع التهابی مثل آنهایی که ممکن است از استرس صدای بلند ایجاد شوند؛ ایفا می‌نماید. سطوح NGF در بافت‌های ملتهب افزایش می‌یابند. این نوروتروفین نقش مهمی را در ایجاد حس درد بیش ازحدالتهابی ایفا می‌نماید (۱۸).

Bruns و Miller نشان دادند اتانول می‌تواند بیان NGF قشری را القا نماید. کانون توجه این مطالعه، لایه v اجسام سلول نورونی بیان کننده رسپتور تنفسی اصلی بود. مغزها بلافاصله بعد از ۶ ساعت در معرض قرارگیری در برابر اتانول جمع‌آوری شدند. مطالعات ایمنی بافتی شیمیایی – هیبریداسیون نشان داد که بسیاری از استروماهای نورونی،mRNA NGF را بیان نموده‌اند. در مقابل اتانول تعداد نورون‌های بیان کننده mRNA NGF و میزان mRNA NGF بیان شده در هر سلول را افزایش داد. به‌علاوه اتانول غلظت قشری کلی پروتئین NGF، تعداد نورن‌های لایه v بیان کننده، میزان

mRNA trkA بیان شده در هر نورون و فسفوریلاسیون trkA را افزایش داد (۱۹).

Schültke و همکاران عنوان نمودند کوئرستین موجود در گیاه بابونه از طریق کاهش ماکروفاژها در محل صدمه، باعث افزایش عملکردهای حرکتی در موش‌های صحرایی صدمه دیده شده است (۲۰). همچنین Schültke و همکاران بیان کردند این ترکیب اثر ضدالتهابی خود را از طریق بلوک تولید پیش‌التهاب‌های بیوشیمیایی مثل لوکوترین و پروستاگلاندین اعمال کرده و نیز آزادسازی هیستامین و دیگر میانجی‌های آلرژیک را مهار می‌کند (۲۱).

این نتایج همراستا با نتایج حاصل از مطالعه حاضر است که در گروه‌های تیمار به دلیل افزایش بیان ژن NGF از شدت التهاب کاسته شده و اثرات ترمیمی زودتر نمایان شده است. در صورتی که در گروه کمپرسیون به علت کاهش بیان ژن NGF ترمیمی مشاهده نشد و اثرات التهابی به‌صورت تخریب نورونی دیده شد. باتوجه به گزارشات فوق نتایج مطالعه حاضر با این نتایج همخوانی دارد که تجویز عصاره هیدروالکلی، فراکسیون انبوتانول، فراکسیون اتیل‌استات و فراکسیون آبی بابونه به موش‌های دارای ضایعه عصبی موجب تولید و افزایش عوامل نوروتروفیک از جمله NGF شد.

تحقیقات دیگر نشان داده NGF ترمیم نورون‌های حرکتی را تسریع می‌نماید. تحت شرایط فیزیولوژیکی اثرات NGF به مرحله رشدی نورون‌ها وابسته است. طی دوره وقوع طبیعی مرگ سلولی نورونی، NGF درجه بقای جمعیت خاصی از نورون‌ها را تنظیم می‌کند. برای مثال NGF فعالیت و سنتز آنزیم‌های درگیرشده در سنتز ناقل عصبی و سنتز نوروپپتیدها را تنظیم می‌نماید. NGF مانع از تجزیه و تخریب نورون‌های کولینرژیک مغز جلویی قاعده‌ای بعد از برداشتن آکسون می‌شود و عملکرد رفتاری حافظه آسیب‌دیده موش‌های پیر را بهبود می‌بخشد. همچنین NGF می‌تواند مانع از تخریب نورونی بعد از برداشتن آکسون در سیستم عصبی محیطی شود (۲۲). احتمالاً عصاره‌های هیدروالکلی، فراکسیون انبوتانول، فراکسیون اتیل‌استات و فراکسیون آبی گیاه بابونه با داشتن اثر ضدالتهابی از پیشرفت ضایعه جلوگیری می‌کند. به‌طوری که در مطالعه حاضر نیز پیشرفت ضایعه گروه‌های تیمار کند شده بود.

پیشنهاد می‌گردد در مطالعات آتی از دوزهای مختلف عصاره هیدروالکلی و فراکسیون‌های مختلف آن برای ارزیابی اثر حفاظت نورونی استفاده گردد. همچنین اثر عصاره هیدروالکلی بابونه و فراکسیون‌های آن روی سایر ژن‌های دخیل در فرایند ترمیم عصب سیاتیک ارزیابی گردد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که اثر نوروپروتکتیوی عصاره هیدروالکلی سرشاخه‌های گیاه بابونه می‌تواند ناشی از افزایش بیان ژن عامل رشد عصب باشد که سبب پیشبرد فرایند رژنراسیون در نورون‌های آسیب دیده گردید.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه خانم مریم سیاسرکرباسکی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست‌شناسی گرایش علوم جانوری از دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد بود. بدین‌وسیله از همکاری گروه زیست شناسی و نیز همکاران محترم پژوهشکده خوارزمی که ما را در اجرای این تحقیق یاری نمودند؛ سپاسگزاری می‌نماییم.

References

1. Cameron AA, Vansant G, Wu W, Carlo DJ, Ill CR. Identification of reciprocally regulated gene modules in regenerating dorsal root ganglion neurons and activated peripheral or central nervous system glia. J Cell Biochem. 2003 Apr; 88(5): 970-85.

2. Coleman MP, Perry VH. Axon pathology in neurological disease: a neglected therapeutic target. Trends Neurosci. 2002 Oct; 25(10): 532-7.

3. Kucera J, Ernfors P, Walro J, Jaenisch R. Reduction in the number of spinal motor neurons in neurotrophin-3-deficient mice. Neuroscience. 1995 Nov; 69(1): 321-30.

4. Johnson EO, Charchanti A, Soucacos PN. Nerve repair: experimental and clinical evaluation of neurotrophic factors in peripheral nerve regeneration. Injury. 2008 Sep; 39(Suppl 3): S37-42. doi: 10.1016/j.injury.2008.06.015

5. Helgren ME, Squinto SP, Davis HL, Parry DJ, Boulton TG, Heck CS, et al. Trophic effect of ciliary neurotrophic factor on denervated skeletal muscle. Cell. 1994 Feb; 76(3): 493-504.

6. Lewin GR, Barde YA. Physiology of the neurotrophins. Annu Rev Neurosci. 1996; 19: 289-317.

7. Close R. Dynamic properties of fast and slow skeletal muscles of the rat after nerve cross-union. J Physiol. 1969 Oct; 204(2): 331-46.

8. Yan Q, Elliott J, Snider WD. Brain-derived neurotrophic factor rescues spinal motor neurons from axotomy-induced cell death. Nature. 1992 Dec; 360(6406): 753-5.

9. Moazami Goudarzi M, Azarnia M, Kaka G, Sadraii SH, Khatibi Aghda A. [Study of bone marrow stromal cells, nerve growth factor, and marginal on nerve regeneration in rat crushed sciatic nerve]. J Mazandaran Univ Med Sci. 2013; 23(5): 96-105. [Article in Persian

10. Gaudet AD, Popovich PG, Ramer MS. Wallerian degeneration: Gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. J Neuroinflammation. 2011; 8: 110. doi: 10.1186/1742-2094-8-110

11. Srivastava JK, Shankar E, Gupta S. Chamomile: A herbal medicine of the past with bright future. Mol Med Report. 2010 Nov; 3(6): 895-901. doi: 10.3892/mmr.2010.377

12. Rakhshandah H, Shakeri MT, Ghasemzadeh MR. Comparative hypnotic effect of Rosa damascena fractions and Diazepam in mice. Iranian J Pharmaceuti Res. 2007; 6(3): 193-97.

13. Razavi M, Tehranipour M, Khayatzadeh J. [Effects of aqueous extract of Salvia chloroleuca leaves on degeneration of alpha motoneurons in spinal cord after sciatic nerve compression in rat].

J Shahrekord Univ Med Sci. 2014; 16(2): 22-30. [Article in Persian]

14. Behnam-Rasouli M, Nikravesh M, Mhadavi-Shahri N, Tehranipour M. Post-operative time effects after sciatic nerve crush on the number of alpha motoneurons, using a sterological counting method (disector). Iran Biomed J. 2000; 4(1): 45-49.

15. Basiri F, Imani Fooladi AA, Bagherpoor G, Mahmoodzadeh Hosseini H, Foroutan Koudehi M, Nourani MR. [Hastening the sciatic nerve recovery through inhibitation of TNF-α by the Etanercept]. J Mil Med. 2013; 15(2): 125-32. [Article in Persian]

16. Aghanasir F, Aghai H., Nourani MR. [Lipocalin 2 expression in sciatic nerve regeneration]. Annals of Military and Health Sciences Research. 2012; 10(3): 198-206. [Article in Persian]

17. Arab H, Tavakkol Afshari J, Radvar M, Khosravi R, Khodadoost MA. Association between HLA DQB1-0102 and aggressive periodontitis. J Dent Sch. 2004; 22(3): 478-85.

18. Dai CF, Steyger PS, Wang ZM, Vass Z, Nuttall AL. Expression of Trk A receptors in the mammalian inner ear. Hear Res. 2004 Jan; 187(1-2): 1-11.

19. Bruns MB, Miller MW. Functional nerve growth factor and trkA autocrine/paracrine circuits in adult rat cortex are revealed by episodic ethanol exposure and withdrawal. J Neurochem. 2007 Mar; 100(5): 1155-68.

20. Schültke E, Kendall E, Kamencic H, Ghong Z, Griebel RW, Juurlink BH. Quercetin promotes functional recovery following acute spinal cord injury. J Neurotrauma. 2003 Jun; 20(6): 583-91.

21. Schültke E, Griebel RW, Juurlink BH. Quercetin attenuates inflammatory processes after spinal cord injury in an animal model. Spinal Cord. 2010 Dec; 48(12): 857-61. doi: 10.1038/sc. 2010.45

22. Thoenen H, Bandtlow C, Heumann R. The physiological function of nerve growth factor in the central nervous system: comparison with the periphery. Rev Physiol Biochem Pharmacol. 1987; 109: 145-78.

Original Paper

Neuroprotective effect of n-butanol, ethylacetate, aqueous and hydro-alcoholic fractions of *Anthemis nobilis* extracts through NGF gene expression after sciatic nerve injury in rats

Siasar-Karbasky M (M.Sc)[1], Tehranipour M (Ph.D)*[2], Nejad-Shahrokhabadi Kh (Ph.D)[3]

[1]M.Sc in Animal Science, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran. [2]Associate Professor of Animal Physiology, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran. [3]Assistant Professor of Molecular Genetics, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.

Abstract

Background and Objective: Neurotrophic factors increase neuron survival and growth. In addition their expression is altered in response to nerve injury. This study was done to evaluate the neuroprotective effect of n-butanol, ethylacetate, aqueous and hydro-alcoholic fractions of *Anthemis nobilis* extracts through nerve growth factor (NGF) gene expression after sciatic nerve injury in rats.

Methods: In this experimental study, 36 male Wistar rats were randomly allocated into 6 groups including control group, compression, compression + hydro-alcoholic extract, compression + n-butanol, compression + ethyl acetate fraction and compression + aqueous fraction with dose of 75 mg/kg/bw, respectively. Hydro-alcoholic, aqueous, n-butanol and ethyl acetate extract of *Anthemis nobilis* from aerial parts was prepared by soxhlet method. In control group, after anesthetizing the animals, the muscle was cut at the site of sciatic nerve without damaging and in compression and treatment group, the right sciatic nerve was compressed for 60 sec. The extract first time was injected intraperitoneally after nerve compression and the second was performed 7 days later. After 28 days, samples were prepared from the lumbar portion of spinal cord and cDNA was synthesized and total RNA was extracted. The changes in NGF gene expression evaluated using Δct and Real Time PCR methods.

Results: NGF gene expression significantly reduced in the compression group in compare to control ($P<0.05$). The expression of NGF significantly increased in treated groups including hydro-alcoholic extract, n-butanol, ethyl acetate and aqueous fractions in compare to compression group ($P<0.05$). The expression of NGF was more in hydro-alcoholic extract treated group in comparision with other factions treated groups.

Conclusion: Neuroprotective effect of of the aerial parts of *Anthemis nobilis* may be due to increase of NGF gene expression.

Keywords: *Anthemis nobilis*, Nerve growth factor, Sciatic nerve, Rat

*** Corresponding Author: Tehranipour M (Ph.D), E-mail: maryam_tehranipour@mshdiau.ac.ir**

Received 13 Sep 2015 **Revised** 21 Feb 2016 **Accepted** 29 Feb 2016

Cite this article as: Siasar-Karbasky M, Tehranipour M, Nejad-Shahrokhabadi Kh. [Neuroprotective effect of n-butanol, ethylacetate, aqueous and hydro-alcoholic fractions of *Anthemis nobilis* extracts through NGF gene expression after sciatic nerve injury in rats]. J Gorgan Uni Med Sci. Winter 2017; 18(4): 49-55. [Article in Persian]